

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL *Curcuma longa* L. PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) DIABETES MELLITUS TIPE 1 TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA

SKRIPSI

Oleh:

NINOEK CANDRA DEWI RATNA SARI

105130101111080



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL *Curcuma longa* L. PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) DIABETES MELLITUS TIPE 1 TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

NINOEK CANDRA DEWI RATNA SARI
105130101111080



PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Efek Pemberian Ekstrak Ethanol *Curcuma longa L.* pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1 terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa

Oleh :

NINOEK CANDRA DEWI RATNA SARI
105130101111080

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 29 Desember 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. drh. Djoko Winarso, MS
NIP. 19530605 198403 1 001

drh. Fajar Shodiq P., M.Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : NINOEK CANDRA DEWI RATNA SARI
NIM : 105130101111080
Program Studi : Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi Berjudul : Efek Pemberian Ekstrak Ethanol *Curcuma longa* L. Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1 Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa.

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 Desember 2017
Yang menyatakan

(Ninoek Candra Dewi R.S)
NIM. 105130101111080

EFEK PEMBERIAN EKSTRAK ETHANOL *Curcuma longa* L. PADA TIKUS (*Rattus norvegicus*) DIABETES MELLITUS TIPE 1 TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA

ABSTRAK

Diabetes Melitus (DM) tipe 1 adalah gangguan metabolisme yang disebabkan berkurangnya sekresi insulin akibat kerusakan sel β pankreas sehingga terjadi hiperglikemia. Hiperglikemia pada DM menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga terjadi komplikasi vaskuler sistemik pada jaringan tubuh, termasuk organ reproduksi jantan (testis). Kurkumin adalah salah satu kandungan utama kunyit yang memiliki aktivitas biologis antara lain sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak *Curcuma longa* L. dapat digunakan sebagai terapi DM yang mampu menurunkan ROS sehingga meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Tikus (*Rattus norvegicus*) dibagi menjadi 5 kelompok. Kelompok A (tikus kontrol), kelompok B (tikus induksi MLD-STZ), kelompok C, D dan E diinduksi MLD-STZ yang diterapi ekstrak kunyit dengan dosis 1,2 g/kgBB, 1,8 g/kgBB, dan 2,7 g/kgBB. DM diinduksi dengan MLD-STZ 20 mg/kgBB secara IP. Terapi ekstrak kunyit diberikan selama 42 hari sonde lambung. Perhitungan kualitas spermatozoa dianalisis secara statistik menggunakan *one way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Tukey ($P < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi ekstrak etanol *Curcuma longa* L. secara signifikan ($p < 0,05$) meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Dosis 2.7 g/KgBB adalah dosis terbaik yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa sebesar 79,31% dan viabilitas spermatozoa sebesar 79,73%. Kesimpulan dari penelitian ini, ekstrak *Curcuma longa* L. mampu meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa pada tikus DM tipe 1.

Kata kunci : *Curcuma longa* L., Diabetes Mellitus Tipe 1, Kualitas Spermatozoa, Streptozotocin.

EFFECT OF GIVING ETHANOL EXTRACT *Curcuma longa* L. ON RATS (*Rattus norvegicus*) DIABETES MELLITUS TYPE 1 MODELS TOWARDS MOTILITY AND VIABILITY OF SPERMATOZOA

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) type 1 is a metabolic disorder caused by decreased insulin secretion due to pancreatic β cell damage resulting in hyperglycemia. Hyperglycemia in DM causes increased *Reactive Oxygen Species* (ROS) resulting in complications systemic vascular in body tissues, including the male reproductive organs (testes). Curcumin is one of the main ingredients of turmeric that has biological activity such as antioxidants and anti-inflammatory. This research was conducted to find out that *Curcuma longa* L. extract can be used as DM therapy that can decrease ROS to increase motility and spermatozoa viability. Rat (*Rattus norvegicus*) were divided into 5 groups: Control group (A), diabetes group induced MLD-STZ (B), diabetes group induced MLD-STZ treated with turmeric extract dose 1.2 g/kgBW (C), dose 1.8 g/kgBW (D) and dose 2,7 g/kgBW (E). DM induced with MLD-STZ 20 mg/ kgBW Intraperitoneal. Therapy for given for 42 days orally. Spermatozoa quality was analyzed statistically using a quantitative with one-way Annova then Tukey test ($p < 0,05$). The results significantly showed ($p < 0.05$) that ethanol extract of *Curcuma longa* L. increased motility and viability of spermatozoa. Dose of is 2.7 g/KgBB was most effective to increase motility spermatozoa by 79,31% and viability spermatozoa by 79,73%. The current study shows *Curcuma longa* L. that able to increase motility and viability of spermatozoa in DM type 1.

Keywords : *Curcuma longa* L., Diabetes Mellitus Type 1, Quality of Spermatozoa, Streptozotocin.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena atas rahmat dan karuniaNya yang senantiasa dilimpahkan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul **“Efek Pemberian Ekstrak Ethanol Curcuma longa L. pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1 terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa”**. Penelitian ini merupakan payung penelitian dari Dr. drh. Djoko Winarso, MS dan drh. Herlina Pratiwi, M.Si serta merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Dalam penyusunan skripsi ini banyak hambatan serta rintangan yang penulis hadapi namun pada akhirnya dapat melaluinya berkat adanya bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak baik secara moral maupun spiritual. Untuk itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada :

1. Dr. drh. Djoko Winarso, MS selaku dosen pembimbing 1 yang berkenan meluangkan waktu, tenaga, pikiran, kesabaran serta senantiasa memberikan dorongan dan arahan selama penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Sri Murwani, drh., MP dan drh. Fajar Shodiq Permata, M.Biotech selaku dosen pembimbing 2 yang berkenan meluangkan waktu, tenaga, pikiran, kesabaran serta senantiasa memberikan dorongan dan arahan selama penyusunan skripsi ini.
3. drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M.Biotech selaku dosen penguji 1 dan drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes selaku dosen penguji 2 yang berkenan memberi masukan, arahan dan motivasi dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
5. Seluruh jajaran Dekanat, Dosen dan Staf Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
6. Keluarga besar terutama Ibu Satimah, Bapak Karnadi, kakak Iin Dwi Lestari, SH., Rudy Tri Laksono, Diana Catur Wahyuni, SH., dan Naniek Panca

Yuliandari yang begitu ikhlas menyayangi, memberikan semangat, doa, dan dukungan yang tak terhingga kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.

7. Teman-teman angkatan 2010 khususnya kelas C (COMPAC), tim menang 2010 (Ella, Ega, Putri, Rosa, Minca, Tenty, Dimas, Rizky) yang selalu memberikan dukungan, semangat, inspirasi dan motivasi.
8. Seluruh staf serta asisten Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bantuan yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.
9. Tim Penelitian khususnya Bernadhita, Devi Chandra, Anggy, Bimaldy, dan Nunung yang saling membantu satu sama lain.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

Malang, 29 Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kunyit (<i>Curcuma longa</i> L.)	6
2.1.1 Morfologi dan Taksonomi Kunyit	6
2.1.2 Manfaat Kunyit (<i>Curcuma longa</i> L.)	8
2.1.3 Kandungan Kunyit (<i>Curcuma longa</i> L.)	9
2.2 Diabetes Mellitus	9
2.2.1 Patogenesis Diabetes Mellitus Tipe 1	10
2.2.2 Gejala Klinis	12
2.2.3 Diagnosis	12
2.2.4 Pengobatan	12
2.3 Streptozotocin (STZ)	13
2.3.1 Mekanisme STZ dalam Diabetes Mellitus	13
2.4 Spermatozoa	15
2.4.1 Morfologi Spermatozoa	15
2.4.2 Spermatogenesis	16
2.5 Pengaruh Diabetes Melitus terhadap Kualitas Spermatozoa	18
2.5.1 Penilaian Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa	18
2.6 Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	18
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	22
3.1 Kerangka Konsep	22
3.2 Hipotesis Penelitian	26
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	27
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	27

4.2 Alat dan Bahan Penelitian	27
4.2.1 Alat	27
4.2.2 Bahan	27
4.3 Tahapan Penelitian	28
4.4 Prosedur Kerja	28
4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba	28
4.4.2 Variabel Penelitian	31
4.4.3 Pembuatan Ekstrak Kunyit	31
4.4.4 Pembuatan Hewan Model DM dengan Streptozotocin	32
4.4.5 Penentuan dan Terapi Ekstrak Kunyit	32
4.4.6 Pengambilan Sekresi Cauda Epididimis	33
4.4.7 Penilaian Motilitas Spermatozoa	33
4.4.8 Penilaian Viabilitas Spermatozoa	34
4.5 Analisis Data	34
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	35
5.1 Efek Induksi Streptozotocin (STZ) Dalam Pembuatan Hewan Model Diabetes Mellitus Tipe 1	35
5.2 Efek Pemberian Ekstrak Ethanol <i>Curcuma longa</i> L. Pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Diabetes Mellitus Tipe 1 Terhadap Motilitas Spermatozoa	35
5.3 Efek Pemberian Ekstrak Ethanol <i>Curcuma longa</i> L. Pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Diabetes Mellitus Tipe 1 Terhadap Viabilitas Spermatozoa	39
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	47
6.1 Kesimpulan	47
6.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Kelompok perlakuan hewan coba	28
5.1 Rata-rata motilitas spermatozoa pada tikus berbagai perlakuan	36
5.2 Rata-rata viabilitas spermatozoa pada tikus berbagai perlakuan	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 A. Tanaman Kunyit	7
B. Rimpang Kunyit	7
2.2 Struktur spermatozoa	15
3.1 Kerangka Konseptual	22
5.1 Viabilitas spermatozoa kontrol negatif	40
5.2 Viabilitas spermatozoa kontrol positif	41
5.3 Viabilitas spermatozoa terapi dosis 1,2 g/KgBB	41
5.4 Viabilitas spermatozoa terapi dosis 1,8 g/KgBB	42
5.5 Viabilitas spermatozoa terapi dosis 2,7 g/KgBB	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Penghitungan Dosis dan Pengenceran Ekstrak Kunyit	53
2. Tahapan Penelitian	55
3. Pembuatan Ekstrak Kunyit	56
4. Diagram Kerja Penelitian	57
4.1 Pengambilan sekresi cauda epididimis	57
4.2 Pengamatan motilitas spermatozoa	57
4.3 Pengamatan viabilitas spermatozoa	58
5. Hasil uji statistika motilitas spermatozoa dengan SPSS	59
6. Hasil uji statistika viabilitas spermatozoa dengan SPSS	62
7. Komisi etik penelitian Universitas Brawijaya	65
8. Determinasi tanaman kunyit	66
9. Hasil pengukuran berat badan dan kadar glukosa darah tikus	67

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Singkatan/Lambang</u>	<u>Keterangan</u>
AGEs	<i>Advanced Glycation End Products</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ATP	Adenosin Tri Phosphat
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Derajat Celcius
BB	Berat Badan
DM	Diabetes Melitus
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FSH	<i>Follicel Stimulating Hormon</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormon</i>
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i>
IDDM	<i>Insulin Dependent Diabetes Melitus</i>
LH	<i>Luteinizing Hormon</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NaCl	<i>Natrium Chlorida</i>
NAD	<i>Nikotinamida Adenine Dinukleotida</i>
NO	Nitrogen Oksida
Na ₂ CO ₃	Natrium Karbonat
NIDDM	<i>Non Insulin Dependent Diabetes Melitus</i>
O ₂ ⁻	Superoksida
OH ⁻	Radikal Hidroksil
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PFA	<i>Paraformaldehyde Acid</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PUFA	<i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
ROO ⁻	Peroksil

ROS
WHO

Reactive Oxygen Spesies
World Health Organization



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes melitus (DM) diketahui sebagai penyebab berbagai masalah medis, psikologis dan seksual. DM adalah gangguan metabolisme kronik yang kompleks karena berkurangnya hormon insulin baik absolut atau relatif yang menimbulkan kelainan metabolisme karbohidrat, protein dan lipid. Kadar gula darah yang terus menerus tinggi dalam diabetes dapat mempengaruhi fungsi dari sistem reproduksi jantan. Kondisi hiperglikemia berkaitan erat dengan meningkatnya kerusakan jaringan dan gangguan fungsi organ reproduksi (Amaral *et al.*, 2008).

Menurut data World Health Organization (WHO), total penderita DM di Indonesia saat ini sekitar 8 juta jiwa, dan diperkirakan jumlahnya melebihi 21 juta jiwa pada tahun 2025 mendatang. Kejadian DM selain terjadi pada manusia juga sering terjadi pada hewan, *The Center for Disease Control and Prevention* (CDC) tahun 2008 menyatakan bahwa di Amerika berdasarkan hasil pemeriksaan dokter hewan kejadian DM pada anjing dan kucing bervariasi. Pada anjing mulai dari rasio 1 : 200 dan pada kucing 1 : 800. Kasus yang paling umum dari diabetes pada anjing adalah DM tipe 1, sedangkan pada kucing biasanya menderita DM tipe 2. DM pada statistik menunjukkan bahwa anjing yang berusia muda memiliki kemungkinan lebih kecil beresiko terkena diabetes dibandingkan dengan anjing dewasa. Pada kucing kerentanan terkena DM terjadi lebih acak serta tidak tampak ada hubungan dengan usia atau jenis kelamin.

Komplikasi DM yang sering terjadi salah satunya adalah komplikasi pada sistem reproduksi jantan. Testis merupakan salah satu jaringan yang peka terhadap peningkatan ROS. Akumulasi ROS dalam testis dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel-sel fungsional didalamnya (Diemer *et al.*, 2009). Komplikasi DM pada organ reproduksi jantan telah banyak ditemukan baik pada penderita maupun hewan coba. Komplikasi ini juga mengakibatkan gangguan spermatogenesis berupa penurunan kualitas spermatozoa (Agbaje *et al.*, 2007). Salah satu parameter kualitas spermatozoa yang bisa teramati adalah motilitas dan viabilitas spermatozoa. Pada beberapa penelitian disebutkan kerusakan suatu organ berasosiasi dengan peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) dari suatu organ. Hiperglikemia menyebabkan peningkatan ROS yang akan mengaktifkan jalur polyol, *advanced glycation end products* (AGEs), Protein Kinase C (PKC) dan jalur heksosamin. Keempat jalur ini akan menyebabkan kerusakan sel (Brownlee, 2005). Stress oksidatif memainkan peran pada terjadinya komplikasi DM.

Biaya pengobatan DM cukup mahal, sehingga perlu dikembangkan juga alternatif pencegahan dan pengobatan dengan biaya yang lebih murah dan bahan yang lebih mudah didapat. Penggunaan *herbal medicine* telah menjadi bagian penting dari kehidupan manusia sejak dulu kala sampai sekarang, terutama di negara berkembang. Ada beberapa mekanisme pada tanaman obat yang dapat membantu pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit,

diantaranya tanaman obat yang dapat membantu pencegahan dan pengobatan DM (Maryatun, 2010).

Kunyit merupakan salah satu bahan baku produk herbal yang banyak penggunaannya di Indonesia. Komponen yang terpenting dari rimpang kunyit adalah minyak atsiri dan kurkumin. Kandungan kurkumin pada kunyit berkisar 4 – 8% dalam simplisia rimpang, yang merupakan agensia farmakologis paling aktif. Kurkumin memiliki berbagai aktivitas biologis antara lain sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan antikanker (Ritmaleni dan Ari Simbara, 2010).

Dari latar belakang diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak kunyit (*Curcuma longa L.*) dapat digunakan sebagai terapi DM yang mampu menurunkan produksi ROS yang dapat menghambat kerusakan sel sehingga meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa.

1.2 Rumusan Masalah

- 1) Apakah pemberian ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* dapat meningkatkan motilitas spermatozoa pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus tipe 1 ?
- 2) Apakah pemberian ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus tipe 1 ?

1.3 Batasan Masalah

Dari latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 195-KEP-UB.
- 2) Pembuatan keadaan diabetik pada hewan model tikus dilakukan dengan cara injeksi intraperitoneal streptozotocin (STZ) dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am, dkk., 2005).
- 3) Dosis ekstrak kunyit 1,2 g/kg BB (dosis I), 1,8 g/kg BB (dosis II), dan 2,7 g/kg BB (dosis III). Ekstrak ini diberikan secara PO selama 42 hari (Zhang *et al.*, 2013)
- 4) Ekstraksi kunyit menggunakan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 (Basalmah, 2006).
- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah motilitas dan viabilitas spermatozoa.
- 6) Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan mengamati spermatozoa yang telah ditetaskan ke *object glass* dengan perbesaran 400x. Penilaian dilakukan berdasarkan spermatozoa yang bergerak progresif yang diamati dalam lima kali lapangan pandang dan kemudian di rata-rata (Rahmanisa, 2013).

- 7) Pengamatan viabilitas dilakukan atas spermatozoa yang hidup pada lima kali lapangan pandang dengan perbesaran 400x yang kemudian di rata-rata. Untuk menentukan persentase spermatozoa yang hidup dengan menggunakan rumus :
$$\frac{\text{Jumlah sperma yang hidup}}{\text{Jumlah sperma keseluruhan}} \times 100 \%$$

(Hardijanto dkk., 2008).

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui efek ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* dalam meningkatkan motilitas spermatozoa pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus tipe 1.
2. Mengetahui efek ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* dalam meningkatkan viabilitas spermatozoa pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus tipe 1.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi perkembangan obat herbal di Indonesia, serta manfaat ekstrak ethanol kunyit (*Curcuma longa L.*) sebagai terapi alternatif untuk DM tipe 1 pada hewan dan manusia.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kunyit (*Curcuma longa* L.)

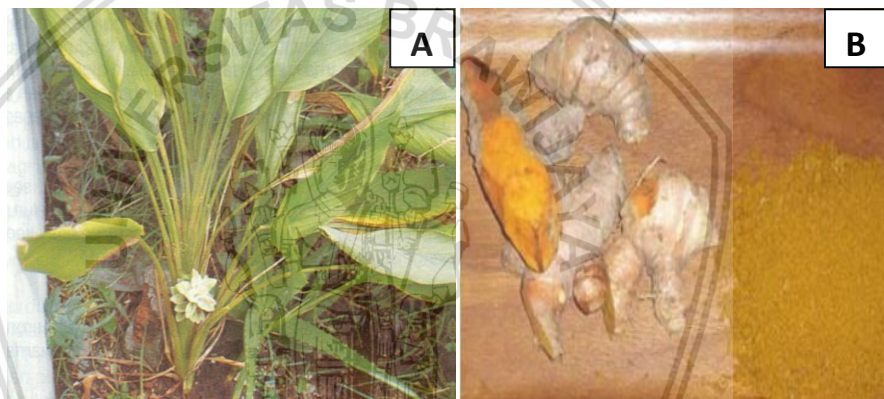
Lebih dari 60% produk farmasi berasal dari tanaman. Salah satu tanaman obat yang telah lama dikenal dan dibudidayakan adalah kunyit. Kunyit (*Curcuma longa* Linn atau *Curcuma domestica* Val.) termasuk dalam famili *Zingiberaceae*, telah lama dikenal oleh masyarakat sebagai tanaman yang sangat banyak manfaatnya. Kunyit telah lama digunakan sebagai tanaman obat yang dapat dipakai untuk mengobati berbagai penyakit (Jain *et al.*, 2007).

2.1.1 Morfologi dan Taksonomi Kunyit

Kunyit merupakan tanaman herbal, dengan tinggi mencapai 100 cm. Batang semu, tegak, bulat, membentuk rimpang, berwarna hijau kekuningan. Daun tunggal, lanset memanjang, helai daun berjumlah 3-8 dan pangkal runcing, tepi rata, panjang 20-40 cm, lebar 8-12.5 cm, pertulangan menyirip, berwarna hijau pucat. Bunga tumbuh dari ujung batang semu, panjang 10-15 cm, bunga berwarna kuning atau kuning pucat, mekar secara bersamaan (Gambar 2.1). Menurut Hudayani (2008), bagian dari tanaman kunyit yang berada di dalam tanah disebut rimpang yang memiliki warna kuning jingga (Gambar 2.2). Rimpang induk bercabang, rimpang cabang lurus atau sedikit melengkung, keseluruhan rimpang membentuk rumpun yang rapat, berwarna jingga, tunas muda berwarna putih. Akar serabut berwarna coklat muda (Syukur dan Hernani, 2002).

Klasifikasi kunyit menurut Linnaeus dalam Winarto (2003), selengkapnya adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophita
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Subkelas	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: Curcuma
Spesies	: <i>Curcuma Longa Linn.</i>



Gambar 2.1 A) Tanaman Kunyit; B) Rimpang Kunyit

Kunyit dapat tumbuh di daerah tropis dan sub tropis mulai dari ketinggian 240-2000 meter di atas permukaan laut (dpl). Daerah dengan curah hujan 2000-4000 mm/tahun merupakan tempat tumbuh yang baik bagi kunyit. Kunyit dapat pula tumbuh di daerah dengan curah hujan kurang dari 1000 mm/tahun, tetapi diperlukan pengairan yang cukup dan tertata dengan baik (Syukur dan Hernani, 2002). Kunyit dapat tumbuh dan biasa ditanam di Asia Selatan, Cina, Taiwan, Indonesia, dan Filipina (Tilaar, 2002).

Kunyit merupakan jenis rempah-rempah yang sangat dikenal masyarakat di seluruh Indonesia. Rimpang kunyit mengandung kurkumin yang berwarna kuning, saponin, flavonoid, minyak atsiri, dan polifenol (Gunawan, 2002).

2.1.2 Manfaat Kunyit (*Curcuma longa* L.)

Dalam rimpang kunyit (*Curcuma longa* L.) terdapat kurkumin yang merupakan bagian terbesar pigmen warna kuning yang memiliki berbagai aktivitas biologis antara lain sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, dan antikanker (Ritmaleni dan Ari Simbara, 2010).

1. Menurut Rustam *et al.* (2007), kurkuminoid yang terkandung di dalam kunyit sebagai salah satu senyawa hasil isolasi maupun kurkuminnya mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang menangkal radikal terhadap radikal hidroksil, anion superoksid, dan oksigen singlet.
2. Kandungan kurkumin dalam kunyit sebagai antiinflamasi adalah dengan menghambat aktivitas enzim siklooksigenase (Erlina *et al.*, 2007).
3. Kunyit mempunyai aktivitas antibakteri yang signifikan pada *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Jain *et al.*, 2007).
4. Kurkumin mampu menghambat aktivitas protein kinase C (PKC). Penghambatan terhadap PKC berarti menghambat satu proses perkembangbiakan sel sehingga senyawa yang menghambat aktivitas PKC tersebut berpotensi sebagai antikanker atau sebagai zat kemopreventif (Liu and Lin, 1993 *cit* Meiyanto, 1999).

2.1.3 Kandungan Kunyit (*Curcuma longa L.*)

Beberapa kandungan kimia dari rimpang kunyit yang telah diketahui yaitu minyak atsiri sebanyak 6%, zat warna kuning yang disebut kurkuminoid sebanyak 5% (meliputi kurkumin, (mono)demetoksikurkumin dan (bis)demetoksikurkumin), protein, fosfor, kalium, besi dan vitamin C. Dari ketiga senyawa kurkuminoid tersebut, kurkumin merupakan komponen terbesar. Kandungan kurkumin dalam kunyit mencapai 50-60%, sedangkan komponen (mono)demetoksikurkumin dan (bis)demetoksikurkumin hanya terdapat dalam jumlah kecil (Parinussa & Timotius, 2006).

2.2 Diabetes Melitus

Salah satu penyakit sistemik yang banyak menyebabkan infertilitas adalah DM. DM merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan terjadinya hiperglikemi yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin dan atau kerja insulin, sehingga terjadi abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein (Bashandy, 2007).

Klasifikasi DM berdasarkan WHO meliputi :

1. Diabetes melitus tipe I (*insulin dependent diabetes mellitus/IDDM*).
Pada tipe ini terjadi defisiensi insulin karena tidak terdapat sel-sel *langerhans*, terjadi pada semua usia, umumnya usia muda, berhubungan dengan tipe *human leucocyte antigens* (HLA) spesifik.
2. Diabetes melitus tipe II (*non insulin dependent diabetes mellitus/NIDDM*).

Diabetes melitus yang sering terjadi pada dewasa, dengan kecenderungan familial, dengan penderita kelebihan berat badan dan *ketosis* resisten.

3. Gangguan toleransi glukosa.

Disebut diabetes asimtomatis dimana kadar glukosa antara normal dan diabetes. Dapat menjadi diabetes melitus atau tetap tidak berubah.

4. Diabetes gestasional.

Diabetes melitus yang timbul pada waktu hamil berupa gangguan kadar gula darah puasa dan 2 jam sesudah makan atau 2 jam sesudah *TTGO*, yang hilang sesudah melahirkan.

5. Diabetes sekunder.

Hiperglikemi karena penyakit lain ; penyakit pankreas, gangguan hormonal lainnya, obat-obatan, gangguan reseptor insulin, sindroma genetik.

2.2.1 Patogenesis Diabetes Melitus Tipe 1

Diabetes melitus dapat dicirikan dengan adanya kerusakan sel β pankreas yang menghasilkan insulin melalui proses autoimun yang bersifat patogenik. Menurut Kumar (2003) menjelaskan bahwa temuan patologis di pankreas tidak selalu mencolok dan sangat bervariasi. Komplikasi tingkat keparahan organ yang terjadi berbeda pada tiap pasien, dapat terjadi arteri/arterosklerosis, membran basal pembuluh halus/mikroangiopati, retina/retinopati, saraf/neuropati dan ginjal/nefropati (Kumar, 2007).

Keadaan DM tipe 1 sangat tergantung pada insulin dan terutama adanya peningkatan frekuensi HLA (*Human Leucocyte Antigen*) dan MHC (*Major Histocompatibility Complex*). Sistem HLA adalah kompleks histokompatibilitas mayor yaitu kelompok gen yang mengkode transplantasi antigen dan respon imun (Behrman *et al.*, 1996).

Diabetes melitus dapat menimbulkan komplikasi mikro dan makrovaskuler tergantung pada adanya gangguan kadar glukosa darah. Gangguan kadar glukosa darah ini memiliki dua komponen, yaitu hiperglikemia kronik dan fluktuasi kadar glukosa darah akut. Kedua komponen ini menyebabkan terjadinya komplikasi DM melalui dua mekanisme utama, yaitu glikasi protein yang berlebihan dan stres oksidatif. Sumber utama terjadinya stres oksidatif pada DM adalah auto-oksidasi glukosa, produksi reactive oxygen species (ROS) yang berlebih di mitokondria, glikasi nonenzimatik, aktivasi jalur poliol sorbitol (Lemos *et al.*, 2012).

Glikasi nonenzimatik antara glukosa dan asam amino akan membentuk akumulasi *advanced glycation endproducts* (AGE). Advanced glycation end products akan menghasilkan berbagai efek merugikan melalui berbagai mekanisme. Pertama, pembentukan AGE yang terjadi pada matriks ekstraseluler akan menyebabkan terjadinya ekspansi matriks dan selanjutnya akan menyempitkan lumen pembuluh darah. Kedua, pembentukan AGE yang terjadi pada intraseluler akan menginduksi stres oksidatif dan meningkatkan produksi anion superoksida pada mitokondria. Ketiga, AGE yang berinteraksi

dengan reseptornya (RAGE) akan mempengaruhi aktivasi jalur sinyal intrasel yang menyebabkan pelepasan ROS dan sitokin inflamasi pada sel β pankreas (Hudson *et al.*, 2002)

2.2.2 Gejala Klinis

DM mempunyai gejala khas peningkatan selera makan (polifagia) akibat menurunnya simpanan kalori, Peningkatan dalam berkemih (poliuria) dan rasa haus (polidipsia) akibat dari kehilangan cairan yang berlebihan, dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan sebabnya. Gejala lain yang dikeluhkan adalah rasa lemah, kesemutan, gatal-gatal, mata kabur dan disfungsi ereksi pada pria (Kumalasari, 2006).

2.2.3 Diagnosis

Diagnosis DM ditegakkan berdasarkan gejalanya yaitu 3P (*polidipsi, polifagi, poliuri*) dan hasil pemeriksaan darah yang menunjukkan kadar gula darah yang tinggi (tidak normal). Hiperglikemia terjadi jika kadar gula dalam darah lebih besar dari 130 mg/dl. Pada anjing hiperglikemia terjadi jika kadar gula dalam darah lebih besar dari 180-200 mg/dl dan pada kucing jika kadar gula dalam darah lebih besar dari 200-280 mg/dl (Aga, 2009). Pada tikus kadar gula darah normal kurang dari 126 mg/dl, kondisi hiperglikemia jika kadar gula lebih besar dari 200 mg/dl (Sigma, 2009).

2.2.4. Pengobatan

Diabetes Melitus dapat ditanggulangi dengan pemberian obat, pengaturan diet secara maksimal untuk pengembalian kadar glukosa darah

dan pemberian preparat hormonal. Obat yang sering digunakan dalam mengatasi penyakit DM adalah :

- Insulin (parenteral)

Insulin merupakan hormon yang menaikkan pengambilan glukosa ke dalam sel-sel sebagian jaringan, menaikkan pembentukan glikogen dalam hati dan otot serta mencegah penguraian glikogen, menstimulasi pembentukan lemak dan protein dari glukosa. Semua proses ini menyebabkan kadar glukosa darah menurun akibat pengaruh insulin (Mutschler, 1991).

2.3 Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin merupakan *N-nitroso* derivat *D-glucosamine* dipakai secara luas untuk menginduksi model hewan coba diabetes melitus tipe 1 maupun tipe 2, disintesis dari *Streptomyces achromogenes*.

2.3.1 Mekanisme STZ dalam Diabetes Melitus

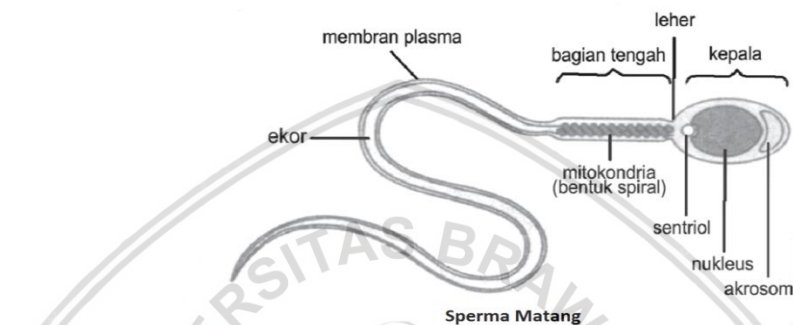
Induksi STZ akan menyebabkan terjadinya alkilasi DNA. Kerusakan DNA akan memicu produksi enzim poli (ADP ribosa) sintase, yaitu enzim yang diperlukan untuk memperbaiki kerusakan DNA. Enzim ini memerlukan NAD (*nikotinamida adenine dinukleotida*) sebagai substratnya, sehingga kandungan NAD⁺ dalam sel menurun. Menurunnya kadar NAD selular juga menyebabkan penurunan jumlah ATP sehingga sintesis dan sekresi insulin dapat terhambat yang menyebabkan hiperglikemia. *Streptozotocin* sebagai donor NO yang mampu meningkatkan spesies oksigen reaktif (ROS) diantaranya radikal superoksida (O₂⁻), radikal hidroksil (OH) dan hydrogen

peroksida (H_2O_2). Dalam mitokondria, STZ menyebabkan siklus krebs terhambat serta pemakaian oksigen dalam mitokondria pun menurun sehingga produksi ATP mitokondria menjadi terbatas. Meningkatnya penurunan produksi ATP dalam mitokondria dapat meningkatkan pasokan substrat untuk enzim *xantin* oksidase akan mengkatalisis reaksi - pembentukan anion superoksida (O_2^-) aktif (Nugroho, 2004). Peningkatan radikal superoksida menyebabkan meningkatnya hidrogen peroksida dan radikal hidroksil yang mengakibatkan terjadinya kerusakan pankreas dan terhambatnya sintesis dan sekresi insulin sehingga terjadi hiperglikemia. Pemberian STZ menimbulkan efek diabetogenik diinisiasi oleh ROS melalui efek toksik langsung pada GLUT 2. STZ merupakan antigen bagi sel T dan ROS memicu aktivasi sel T. Pada awalnya sel T menyebabkan sedikit kerusakan pada sel β pankreas, selanjutnya menginisiasi terjadinya proses radang dengan atau tanpa sekresi sitokin untuk mengaktifkan sel T lainnya, dan menyebabkan kerusakan total sel β untuk kemudian menyebabkan diabetes mellitus (Jones, 2005).

Streptozotocin bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA). Kerusakan pada mitokondria DNA yang disebabkan peningkatan radikal bebas menyebabkan gangguan hormonal pada testis, sehingga kualitas spermatozoa turun dikarenakan testis mengalami atropi (Rachman, 2001).

2.4 Spermatozoa

Menurut Guyton (1996) ketika spermatid dibentuk pertama kali, spermatid tetap memiliki sifat-sifat yang biasa dari sel-sel epiteloid. Tetapi segera setelah spermatid mulai memanjang menjadi spermatozoa, spermatozoa terdiri atas kepala, badan, dan ekor (Gambar 2.3).



Gambar 2.2 Struktur spermatozoa (Ruiz, 2007)

2.4.1 Morfologi Spermatozoa

1. Kepala terutama dari nukleus yang mengandung informasi genetik sperma, terdiri atas sel berinti padat dengan hanya sedikit sitoplasma dan lapisan membran sel di sekitar permukaannya.
2. Dibagian luar, dua pertiga anterior kepala terdapat selubung tebal yang disebut akrosom. Selubung ini mengandung sejumlah enzim yang serupa dengan enzim yang ditemukan pada lisosom sel-sel khusus, termasuk *hialuronidase*, yang dapat mencerna filamen proteoglikan dari jaringan, dan enzim proteolitik yang sangat kuat, yang dapat mencerna protein. Enzim ini memainkan peranan yang penting sehingga memungkinkan sperma untuk membuahi ovum (Guyton, 1996).
3. Ekor spermatozoa memiliki tiga komponen, yaitu aksonema yang serupa dengan silia, membran sel tipis yang menutupi aksonema, dan

mitokondria yang mengelilingi aksonema di bagian proksimal ekor (badan ekor). Gerakan ekor mendekat dan menjauh memberikan motilitas pada spermatozoa. Gerakan ini disebabkan oleh gerakan meluncur longitudinal secara ritmis di antara tubulus posterior dan anterior yang membentuk aksonema. Energi untuk proses ini disuplai dalam bentuk adenosin trifosfat yang disintesis oleh mitokondria pada badan ekor. Spermatozoa normal bergerak dalam garis lurus dengan kecepatan 1 sampai 4 mm/menit.

Menurut Nieschlag *et al* (2000) dalam satu kali ejakulasi rata-rata jumlah spermatozoa adalah 400 juta dengan jumlah semen 3,5 ml. Ketika jumlah spermatozoa dalam setiap mililiter turun kira-kira di bawah 20 juta, maka orang tersebut hampir mengalami infertilitas. Kadang-kadang orang memiliki jumlah spermatozoa yang normal tetapi tetap infertil. Bila hal ini terjadi, sering ditemui hampir separuh dari jumlah spermatozoanya memiliki kelainan morfologi seperti memiliki dua kepala, bentuk kepala yang tidak normal, atau ekor yang tidak normal. Di saat yang lain spermatozoa terlihat normal secara struktural tetapi dengan alasan yang tidak dimengerti spermatozoa tersebut seluruhnya tidak motil atau relatif tidak motil.

2.4.2 Spermatogenesis

Spermatogenesis terjadi di dalam semua tubulus seminiferus selama kehidupan seksual aktif, sebagai akibat dari rangsangan oleh hormon gonadotropin hipofisis anterior, dimulai rata-rata pada usia 13 tahun dan berlanjut sepanjang hidup.

Pada tahap pertama dari spermatogenesis, spermatogonia primitif berkumpul tepat di tepi membran basal dari epitel germinativum, disebut spermatogonia tipe A, yang membelah empat kali untuk membentuk spermatogonia tipe B. Pada tahap ini spermatogonia bermigrasi ke arah sentral di antara sel-sel sertoli.

Untuk jangka waktu rata-rata 24 hari, setiap spermatogonium di antara sel-sel sertoli dimodifikasi secara berangsur-angsur dan membesar untuk membentuk suatu spermatosit primer yang besar. Pada akhir hari ke 24, setiap spermatosit mengalami meiosis pertama yang menghasilkan dua spermatosit sekunder dengan 23 kromosom. Kemudian dilanjutkan dengan meiosis kedua dimana setiap spermatosit sekunder membelah menghasilkan dua spermatid. Dengan demikian setiap spermatid yang terbentuk membawa hanya 23 kromosom, memiliki hanya setengah dari gen-gen spermatogonium yang pertama (Guyton, 1996).

Selama beberapa minggu berikutnya setelah meiosis, setiap spermatid diasuh dan dibentuk kembali secara fisik oleh sel sertoli pembungkusnya, mengubah spermatid secara perlahan-lahan menjadi satu spermatozon dengan menghikangkan beberapa sitoplasmanya, mengatur kembali bahan kromatin dari inti spermatid untuk membentuk satu kepala yang padat, dan mengumpulkan sisa sitoplasma dan membran sel pada salah satu ujung dari sel untuk membentuk ekor.

Semua tahap perubahan akhir dari spermatosit menjadi sperma terjadi ketika spermatosit dan spermatid terbenam dalam sel-sel sertoli. Sel-

sel sertoli memelihara dan mengatur proses spermatogenesis. Seluruh masa spermatogenesis, dari sel germinal sampai sperma, membutuhkan waktu kira-kira 64 hari (Guyton, 1996).

2.5 Pengaruh Diabetes Melitus terhadap Kualitas Spermatozoa

Pada penderita DM sering mengalami penurunan kadar FSH dan LH, dan pada binatang percobaan yang dibuat diabetes hipofisisnya mengalami respon yang menumpul sehingga mengurangi sekresi FSH dan LH. Pada penderita diabetes terjadi tidak sensitifnya insulin dan hiperglikemia yang berdampak pada testis berupa jaringan interstitial testis kehilangan kepadatannya dan penurunan jumlah volume sel Leydig per ruang interstitial. Sehingga gangguan tersebut menyebabkan menurunnya biosintesis androgen dan berkurangnya tingkat serum hormon testosteron (Ballester *et al.*, 2004).

Kadar testosteron menurun akibat berkurangnya amplitudo pelepasan LH karena gangguan pada tingkat axis hipotalamik-pituitari-testikular. Fungsi testosteron antara lain mengontrol proses spermatogenesis pada pembelahan meiosis dan proses spermiogenesis. Penurunan kadar testosteron kemudian mengurangi rangsangan pada kelenjar-kelenjar reproduksi dalam mensekresikan zat-zat yang dibutuhkan oleh spermatozoa, sehingga motilitas dan viabilitas spermatozoa menurun (Kapoor *et al.*, 2005).

2.5.1 Penilaian Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa

Penilaian kualitas spermatozoa meliputi konsentrasi, motilitas, viabilitas, abnormalitas dan gerakan massa spermatozoa. Gerakan massa adalah gerakan dari beberapa spermatozoa bersama-sama sehingga

membentuk suatu gelombang. Gerakan massa mencerminkan daya gerak dan konsentrasi spermatozoa. Gerakan individu atau motilitas spermatozoa dapat dibedakan dalam beberapa tipe, yaitu :

1. Gerakan maju = P (*Progresif*)
2. Gerakan berputar, bergetar = O (*Oscilatory*), V (*Vibratoris*)
3. Gerakan melingkar = C (*Circular*)
4. Gerakan mundur = R (*Reverse*)
5. Spermatozoa yang tidak ada gerakan = N (*Necrospermia*)

Persentase motilitas spermatozoa dibawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan sering berhubungan dengan infertilitas. Kebanyakan pejantan yang fertil mempunyai 50% sampai 80% spermatozoa yang motil aktif progresif. Pemeriksaan motilitas spermatozoa merupakan satu-satunya cara penentuan kualitas semen sesudah pengenceran. Persentase yang hidup adalah jumlah spermatozoa hidup (transparan) yang terhitung dalam persen dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang hidup mempunyai lapisan lipoid pada dinding sel sehingga dapat melindungi masuknya zat warna ke dalam spermatozoa. Spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna. Spermatozoa yang telah mati karena rusak atau hilangnya lapisan lipoid tersebut, maka zat pewarna sangat mudah menembus masuk ke dalam spermatozoa sehingga akan berwarna merah-keunguan. Bentuk-bentuk spermatozoa yang abnormal terutama pada semen yang infertil antara lain : tidak berekor, ekor menggulung, lehernya patah, dan kepala atau ekor ganda (Hardijanto dkk., 2008).

2.6 Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba atau hewan laboratorium adalah hewan yang sengaja dipelihara dan ditenakan untuk dipakai sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorik (Malole dan Pramono, 2000).

Tikus (*Rattus norvegicus*) telah diketahui sifat-sifatnya secara sempurna, mudah dipelihara, dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai penelitian. Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* antara lain memiliki berat 150-600 gram, hidung tumpul dan badan besar dengan panjang 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm (Depkes, 2011).

Menurut Besselsen (2004) dan Depkes (2011) taksonomi tikus adalah:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: Theria
Ordo	: Rodensia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

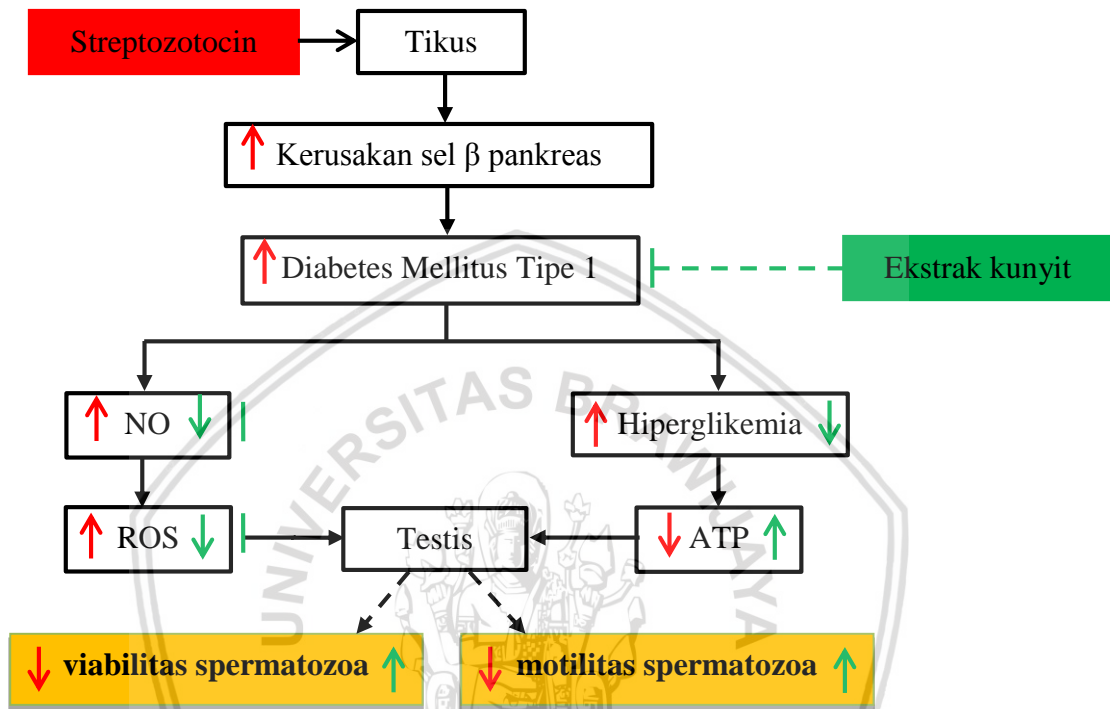
Ada dua sifat utama yang membedakan tikus dengan hewan percobaan lainnya, yaitu tikus tidak dapat muntah karena struktur anatomi yang tidak lazim pada tempat bermuara esofagus ke dalam lambung sehingga

mempermudah proses pencekakan perlakuan menggunakan sonde lambung, dan tidak mempunyai kantung empedu (Smith dan Mangkoewidjojo, 2007).

Penelitian hewan percobaan DM dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa kimia yang bersifat diabetogenik, pembedahan dengan pankreatoktomi atau manipulasi genetik. Tikus *Rattus norvegicus* digunakan sebagai model diabetik spontan maupun dengan induksi zat diabetogenik memiliki kemampuan metabolik yang relatif cepat sehingga lebih sensitif jika digunakan dalam penelitian yang berhubungan dengan metabolik tubuh. Beberapa diabetogenik yang sering digunakan adalah streptozotocin, alloxan, vacor, dithizone, 8-hidroksikuinolon (Covington *et al.*, 1993; Rees dan Alcolado, 2005).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

Variabel bebas	: 	Kandungan kunyit	: - - ->
Variabel Terkendali	: 	Target Kerja	: - - ->
Variabel tergantung	: 	Menghambat	:
Efek pemberian terapi:	: ↓	Induksi STZ	: →
Efek STZ	: ↑		
Kandungan kunyit	: - - ->		

Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Induksi streptozotocin (STZ) pada tikus akan menghasilkan perubahan DNA sel β pankreas yang didahului oleh pembatasan pembentukan adenosin trifosfat pada mitokondria akibat peningkatan enzim *xanthine oxidase*, penghambatan siklus Krebs, dan pembentukan radikal bebas. Peningkatan produksi ROS yang berlebih akan mengakibatkan terjadinya kerusakan pankreas dan terhambatnya sintesis dan sekresi insulin. Produksi insulin yang menurun secara absolut mengakibatkan glukosa akan tetap berada di dalam pembuluh darah sehingga kadar glukosa darah meningkat, dan menyebabkan tikus menderita diabetes mellitus (DM) tipe 1.

DM pada tikus induksi STZ dapat menyebabkan hiperglikemia yang merupakan gejala awal terjadinya DM tipe 1. Kondisi hiperglikemia ini dapat memicu terjadinya stress oksidatif di dalam tubuh yang menimbulkan perubahan struktur maupun fungsi jaringan reproduksi jantan, yang ditandai dengan menurunnya kualitas spermatozoa. Stress oksidatif ini dapat menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid, protein, dan DNA membran sel, yang selanjutnya terjadi apoptosil sel diantaranya sel spermatozoa.

Induksi STZ dapat meningkatkan produksi ROS pada testis salah satunya melalui peroksidasi lipid. Target utama yang rentan terhadap aktivitas ROS adalah *poly unsaturated fatty acid* (PUFA) yang berada dalam membran sel. Selain itu, ROS dapat diperkuat dengan interaksi hidrogen peroksida dengan superoksida sehingga dapat meningkatkan peroksidasi lipid. Hasil dari peroksidasi lipid memiliki dampak negatif pada fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria, peroksidasi lipid diperantarai oleh stabilisasi membran plasma dan

membran intraseluler, menghasilkan pengrusakan enzim protease dan pengeluaran Ca^{2+} ke sitosol.

Meningkatnya kadar glukosa darah (hiperglikemia) akan mengakibatkan terjadinya gangguan proses maturasi spermatozoa dalam epididimis terutama proses glikolisis. Proses glikolisis ini akan menghasilkan energi berupa *adenosin trifosfat* (ATP). ATP dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dalam proses pergerakan sehingga dapat tetap motil dan sekaligus untuk mempertahankan daya hidupnya. Energi untuk motilitas spermatozoa disuplai dalam bentuk ATP yang disintesis oleh mitokondria pada badan ekor, sehingga apabila terjadi kerusakan pada membran mitokondria dapat mengganggu motilitas spermatozoa. Kerusakan permeabilitas membran sperma akan menyebabkan terganggunya transport nutrisi yang diperlukan spermatozoa untuk daya tahan hidup (viabilitas) nya.

Salah satu sumber antioksidan eksogen adalah rimpang *kunyit* (*Curcuma longa* L.) karena mengandung kurkumin yang telah terbukti dapat menangkap radikal hidroksil, yaitu salah satu sumber bentuk radikal bebas. Penurunan produksi insulin oleh kerusakan sel β pankreas akibat reaktivitas ROS dapat dicegah dengan adanya kurkumin sebagai antioksidan yang dapat melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, sehingga DM dapat dihambat.

Penurunan kadar glukosa darah pada DM akan menurunkan terjadinya stress oksidatif di dalam tubuh, hal ini disebabkan kurkumin sangat potensial sebagai antioksidan polifenol berfungsi sebagai penangkal radikal bebas seperti superoksida dan radikal hidroksil. Aktivitas antioksidan gugus fenolik

ditunjukkan dengan adanya penghambatan peroksidasi lipid dan penangkal radikal bebas.

Pemberian kunyit sebagai antioksidan dapat menghambat peroksidasi lipid akibat stress oksidatif. Berdasarkan struktur kimianya kunyit memiliki zat aktif yaitu flavonoid yang memiliki gugus hidroksil. Flavonoid berperan sebagai scavenger radikal bebas yang memiliki gugus hidroksil (OH^-) pada cincin aromatic, serta menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid dengan melindungi sel. Rimpang kunyit (*Curcuma longa L.*) berperan sebagai penyumbang elektron-elektron dengan mengikat radikal bebas menjadi radikal stabil dan tidak mengambil elektron-elektron yang ada di sekitar membran sel. Kurkumin sebagai antidiabetik mampu menstimulasi sel β pankreas untuk memproduksi dan mensekresi insulin. Insulin berfungsi sebagai hormon untuk memecah glukosa dengan proses glikolisis menjadi energi (ATP) yang dibutuhkan setiap sel dalam tubuh khususnya sel-sel organ reproduksi jantan. Motilitas spermatozoa membutuhkan banyak energi dalam sel spermatozoa, hal ini menjadikan kurkumin sebagai antidiabetik yang dapat memperbaiki kadar insulin hingga normal dan dapat mempercepat proses terbentuknya ATP dari proses glikolisis sehingga berfungsi peningkatan motilitas spermatozoa. Kondisi DM akan menyebabkan peningkatan kadar radikal nitrogen oksida (NO) yang merupakan salah satu penyebab peningkatan ROS yang akan merusak jaringan tubuh, terutama pada organ atau sel reproduksi. Kerusakan pada sel testis akan menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa. Kandungan kurkumin yang berfungsi sebagai antioksidan dapat menghambat stress oksidatif pada kondisi

DM dengan menekan *nitrit oxide* (NO). NO dan menurunkan produksi ROS pada sel-sel atau jaringan tubuh, terutama pada organ atau sel reproduksi sehingga akan menyebabkan peningkatan viabilitas spermatozoa.

3.2 Hipotesis Penelitian

Dari rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Ekstrak *Curcuma longa* L. mampu meningkatkan motilitas spermatozoa pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model DM tipe 1.
2. Ekstrak *Curcuma longa* L. mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa pada hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model DM tipe 1.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2013 – Maret 2014 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Teknologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan, dan Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spuit 1 cc, spuit 5 cc, kandang tikus, botol minum tikus, gunting bedah, oven, alat sonde lambung, *cover glass*, *object glass*, mikropipet 10-100 μL dan 100-1000 μL , mikrotom, *yellow tip*, *blue tip*, pinset, rak tabung reaksi, timbangan digital, blender, kertas saring, sentrifugator, plastik klip, pot salep, erlenmeyer, penangas air, *GlucoDrTM Blood Glucose Test Meter*, pipet, cawan petri, lemari pendingin, inkubator, toples, tisu, mortar, dan mikroskop cahaya.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar umur 8 - 12 minggu dengan berat badan 150 – 200 gram, kunyit (*Curcuma longa L.*), streptozotocin dari *nacalai tesque*, Na_2CO_3 , ethanol 96%, eosin 0,5%, *Paraformaldehyd (PFA)* 4%, PBS

(*Phosphat Buffer Saline*) pH 7,4, alkohol 70%, 80, 90%, 95%, alkohol absolut, NaCl fisiologis, dan aquades steril.

4.3. Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Induksi *streptozotocin*
3. Pembuatan dan penghitungan ekstrak kunyit
4. Pemberian ekstrak kunyit
5. Pengambilan cairan semen dari cauda epididimis
6. Penghitungan motilitas dan viabilitas spermatozoa
7. Analisis data

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu :

Tabel 4.1. Kelompok Perlakuan Hewan Coba

No.	Kelompok	Keterangan
1.	Kontrol Positif	Kelompok tikus diabetes mellitus induksi STZ dosis 20 mg/KgBB selama 5 hari tanpa diberi terapi ekstrak ethanol kunyit.

2.	Perlakuan I	Kelompok tikus diabetes mellitus induksi STZ dosis 20 mg/KgBB dan diterapi ekstrak ethanol kunyit dosis 1,2 g/KgBB selama 42 hari.
3.	Perlakuan II	Kelompok tikus diabetes mellitus induksi STZ dosis 20 mg/KgBB dan diterapi ekstrak ethanol kunyit dosis 1,8 g/KgBB selama 42 hari.
4.	Perlakuan III	Kelompok tikus diabetes mellitus induksi STZ dosis 20 mg/KgBB dan diterapi ekstrak ethanol kunyit dosis 2,7 g/KgBB selama 42 hari.
5.	Kontrol Negatif	Kelompok tikus tanpa perlakuan streptozotocin dan terapi ekstrak kunyit.

Sampel penelitian menggunakan hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150 - 250 gram. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$5n$	≥ 20	Keterangan :
n	$\geq 20/5$	p = jumlah kelompok perlakuan
n	≥ 4	n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Persiapan hewan coba dimulai dengan adaptasi hewan coba selama tujuh hari di laboratorium dengan pemberian makanan berupa pakan ayam buras dewasa dan minum *ad libitum*. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus. Tikus dikandangkan dalam kandang berukuran 30x50x10cm (Scharmann, 1991; Patterson-Kane, 2002). Kandang terbuat dari bak plastik yang dilengkapi penutup kawat, berlokasi pada tempat yang tidak ribut, bebas asap industri serta polutan lainnya. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 20-26°C dan kelembaban udara 40-70% dengan ventilasi yang cukup. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Komposisi pakan yaitu jagung, pollar, katul, DDGS, *rapeseed*, *copra meal*, biji batu, CPO, vitamin dan mineral, yang mengandung air maksimal 12 %, protein kasar 12-14 %, lemak kasar minimal 4 %, serat kasar maksimal 6 %, abu maksimal 7,5 %, kalsium 0,9-1,2 %, dan phosphor 0,6-0,8 % (Wonokoyo, 2013).

4.4.2 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Ekstrak kunyit, dosis streptozotocin
- Variabel tergantung : Motilitas dan viabilitas spermatozoa
- Variabel terkendali : Homogenitas tikus (BB, jenis kelamin, umur, suhu dan pakan)

4.4.3 Pembuatan Ekstrak Ethanol Kunyit

Metode pembuatan ekstrak kunyit menggunakan metode maserasi, langkah pertama dimulai dengan membersihkan kunyit dengan air setelah bersih kunyit dipotong tipis – tipis dan dimasukkan oven dengan suhu 40-60°C hingga kunyit kering. Langkah selanjutnya yaitu proses ekstraksi, simplisia kunyit yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender, kemudian ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan kedalam gelas erlen meyer ukuran 1 liter. Selanjutnya bubuk kunyit tersebut ditambah dengan ethanol 96% sampai menjadi 1 liter kemudian diaduk hingga tercampur. Rendaman kunyit didiamkan selama 24 jam dalam ethanol sampai mengendap, kemudian diambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur dengan dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Selanjutnya larutan campuran etanol dan zat aktif kunyit tersebut dievaporasi menggunakan penangas air pada suhu 80°C sampai ekstrak menjadi kental dan kenyal kemudian ditimbang berat ekstraknya dan dievaporasi kembali dengan menggunakan oven yang bertujuan untuk menghilangkan sisa ethanol. Evaporasi dengan menggunakan oven tersebut

dengan suhu 70°C, setiap 15 menit ekstrak ditimbang hingga sebanyak tiga kali penimbangan ekstrak dengan berat yang sama. Ekstrak kunyit yang telah dievaporasi tersebut sebelum disondekan ke hewan coba diencerkan terlebih dahulu dengan aquades dan Na_2CO_3 (Handayani, 2009).

4.4.4 Pembuatan Hewan Model DM dengan Streptozotocin

Tikus putih jantan strain Wistar berumur 2 - 3 bulan dengan berat badan 150 - 250 gram ditempatkan dalam 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Diadaptasikan selama tujuh hari dengan diberi makan dan minum cukup, setelah tujuh hari adaptasi diberikan injeksi streptozotocin pada 4 kelompok tikus, sisa 1 kelompok tidak diinjeksi karena digunakan untuk kontrol negatif. Pemberian injeksi streptozotocin secara intraperitoneal (IP) dengan dosis 20 mg/kg BB selama lima hari berturut-turut. Pada hari ke-7 setelah penginduksian terakhir streptozotocin dilakukan pengukuran glukosa darah untuk memastikan tikus telah mengalami kenaikan kadar glukosa darah dan mengalami DM dengan menggunakan *glucometer* (Weitsgsser *et al.*, 2007). Hasil pengukuran kadar glukosa darah menggunakan *glucometer* ditunjukkan pada **lampiran 9**.

4.4.5 Penentuan dan Terapi Ekstrak Kunyit

Terapi ekstrak kunyit (*Curcuma longa L.*) dimulai setelah 2 minggu setelah pemberian injeksi streptozotocin yang terakhir. Terapi diberikan pada kelompok II, III, dan IV. Pemberian terapi dilakukan secara per oral melalui sonde lambung selama 42 hari dengan dosis yang berbeda, yaitu dosis 1,2 g/kg BB untuk kelompok (II), dosis 1,8 g/kg BB untuk kelompok (III), dan

dosis 2,7 g/kg BB untuk kelompok (IV). Pemberian terapi rutin dilakukan satu kali per hari (Zhang *et al.*, 2013). Penghitungan dosis ekstrak kunyit dapat dilihat pada **lampiran 1**.

4.4.6 Pengambilan Sekresi Cauda Epididimis

Untuk mendapatkan spermatozoa di dalam sekresi cauda epididimis dilakukan menurut Soehadi dan Arsyad (2013) yaitu sebagai berikut: Setelah 42 hari perlakuan, masing-masing hewan coba dieuthanasia dengan cara dislokasi leher selanjutnya dibedah. Kemudian organ testis bagian cauda epididimis diambil dan diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi NaCl 0,9%. Selanjutnya cauda epididimis dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi 1 ml NaCl 0,9%, kemudian bagian proksimal cauda dipotong sedikit dengan gunting lalu cauda ditekan dengan perlahan hingga cairan sekresi keluar dan tersuspensi dengan NaCl 0,9%. Suspensi spermatozoa dari kauda epididimis yang telah diperoleh dapat digunakan untuk pengamatan yang meliputi motilitas dan viabilitas spermatozoa. Metode pengambilan sekresi cauda epididimis ditunjukkan pada **Lampiran 4**.

4.4.7 Penilaian Motilitas Spermatozoa

Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan metode Partodihardjo (Rahmanisa, 2013). Untuk menentukan motilitas spermatozoa, diambil satu tetes semen dari kauda epididimis ke atas gelas objek lalu ditutup dengan kaca penutup. Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali, dihitung yang pergerakannya progresif maju ke

depan dibandingkan dengan seluruh teramati (bergerak dan tidak bergerak) kemudian dikali dengan 100%. Metode penilaian spermatozoa ditunjukkan pada **Lampiran 4**.

4.4.8 Penilaian Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa diperiksa dengan metoda WHO (1998). Satu tetes semen ditetaskan pada kaca objek kemudian dicampur dengan satu tetes larutan eosin 0,5 %, dibiarkan 1-2 menit agar larutan eosin terserap dalam tubuh, kemudian diamati dengan mikroskop dengan pembesaran 400x. Dihitung spermatozoa yang hidup dan spermatozoa yang mati dalam 100 spermatozoa. Nilai dinyatakan dalam persen, dengan menghitung jumlah spermatozoa yang hidup dibagi jumlah spermatozoa keseluruhan dikali 100% (Hardijanto dkk., 2008). Metode penilaian viabilitas spermatozoa ditunjukkan pada **Lampiran 4**.

4.5 Analisis Data

Data yang akan diperoleh berupa data kuantitatif motilitas dan viabilitas spermatozoa. Data dianalisis secara statistik menggunakan *One Way ANOVA (Analysis of Variance)* pada taraf kepercayaan 95 % dan dilanjutkan dengan uji Tukey apabila ternyata signifikan. Data tersebut disajikan dan dianalisis menggunakan aplikasi *SPSS 16.0 Edition for Windows*.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Induksi Streptozotocin (STZ) Dalam Pembuatan Hewan Model Diabetes Mellitus Tipe 1.

Keberhasilan induksi STZ dalam pembuatan hewan model DM dapat dilihat dari kadar gula darah yang diukur pada hari ke-14 (pasca induksi) dengan menggunakan *glucometer*. Pemberian induksi streptozotocin (STZ) pada kelompok B, C, D, dan E dengan dosis 20 mg/kgBB selama lima hari berturut – turut, induksi dilakukan dengan rute intraperitoneal (IP). Pada proses diabetes mellitus, dilakukan pengukuran kadar gula darah tiap tujuh hari sekali untuk memastikan tikus telah mengalami kenaikan kadar gula darah. Tikus dianggap diabetes apabila kadar gula darah ≥ 200 mg/dL (Triplitt, 2008). Hasil pengukuran pada tikus model diabetes mellitus tipe pada penelitian ini terjadi kenaikan kadar gula darah > 400 mg/dL (**Lampiran 9**), maka dipastikan bahwa sampel tikus tersebut telah menderita diabetes mellitus pada hari ke-14 setelah pemberian STZ.

5.2. Efek Pemberian Ekstrak *Ethanol Curcuma longa L.* Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1 Terhadap Motilitas Spermatozoa.

Diabetes Melitus (DM) tipe 1 merupakan penyakit metabolik yang disebabkan karena kerusakan sel β pankreas sehingga terjadi hiperglikemia. Hiperglikemia dapat meningkatkan radikal bebas sehingga menyebabkan komplikasi pada berbagai organ termasuk organ reproduksi. Menurut penelitian Olatunde *et al* (2014) salah satu tanaman herbal yang dapat

mengobati diabetes melitus adalah *Curcuma longa L.* yang dikenal sebagai kunyit. Kunyit sebagai antioksidan dan antiinflamasi dapat menurunkan radikal bebas dan menghambat induksi sitokin proinflamasi di dalam tubuh.

Hasil pengamatan efek pemberian ekstrak *Curcuma longa L.* pada tikus DM terhadap motilitas spermatozoa menggunakan uji *one-way analisis of varian* (ANOVA) dan uji lanjutan menggunakan uji Tukey menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0,05$) secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 5**. Pemberian terapi ekstrak ethanol rimpang kunyit memberikan pengaruh berupa peningkatan motilitas spermatozoa. Persentase motilitas spermatozoa ditentukan berdasarkan spermatozoa motil progresif dibandingkan seluruh yang diamati (bergerak dan tidak bergerak). Jumlah rata-rata peningkatan motilitas spermatozoa pada berbagai kelompok perlakuan diperlihatkan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-rata motilitas spermatozoa pada tikus berbagai perlakuan

Kelompok		Rata-rata motilitas spermatozoa \pm SD	Penurunan motilitas spermatozoa terhadap KN (%)	Peningkatan motilitas spermatozoa terhadap KP (%)
Kontrol Negatif	(A)	15.950 \pm 1,526 ^c	-	-
Kontrol Positif	(B)	2.550 \pm 0,680 ^a	84,01	-
Dosis 1,2 g/Kg BB	(C)	3.100 \pm 1,089 ^a	-	17,74
Dosis 1,8 g/Kg BB	(D)	7.950 \pm 0,818 ^b	-	67,92
Dosis 2,7 g/Kg BB	(E)	12.325 \pm 3,255 ^c	-	79,31

Keterangan : Notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan.

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) di antara kelompok perlakuan. Hasil ini membuktikan bahwa pemberian terapi ekstrak kunyit berbagai dosis selama 42 hari berpengaruh terhadap persentase motilitas spermatozoa tikus putih DM. Selanjutnya hasil uji lanjutan Tukey (**Lampiran 5**) terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol negatif (A) dan kontrol positif (B). Pada kelompok kontrol positif (B) terjadi penurunan motilitas spermatozoa disebabkan induksi streptozotocin dapat menyebabkan hiperglikemia secara klinis mirip seperti DM tipe 1 pada manusia (Nugroho, 2006) yang dapat menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas dan peroksidasi lipid yang berlebihan pada tingkat jaringan. Argawal *et al.* (2014) melaporkan bahwa spermatozoa sangat rentan terhadap ROS dikarenakan pada membrannya yang terdiri dari *poly unsaturated fatty acids* (PUFAs) dan banyak mengandung elektron tunggal sehingga ROS dengan mudah berikatan dengan membran tersebut. Hal ini akan membentuk reaksi rantai peroksidasi lipid yang meluas yang akan merusak biokimiawi sel sehingga terjadi kerusakan pada struktur membran sel serta membran mitokondria. Kerusakan mitokondria ini menyebabkan terganggunya produksi ATP sehingga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa (Sophia, 2009).

Pemberian ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* pada tikus diabetes melitus selama 42 hari dengan dosis 1,2 g/KgBB, 1,8 g/KgBB dan 2,7 g/KgBB telah menunjukkan adanya peningkatan motilitas spermatozoa. Semakin tinggi dosis terapi ekstrak kunyit maka semakin terlihat adanya

peningkatan motilitas spermatozoa. Pada kelompok terapi dosis 2,7 g/KgBB (E) lebih tinggi dari pada kelompok dosis 1,8 g/KgBB (D) karena motilitas spermatozoa pada kelompok E tidak berbeda nyata terhadap kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan pemberian terapi dosis 2,7 g/KgBB (E) efektif untuk meningkatkan motilitas spermatozoa pada tikus diabetes mellitus tipe 1.

Peningkatan motilitas spermatozoa tikus DM yang diterapi ekstrak ethanol *Curcuma longa* L. pada kelompok dosis 2,7 g/Kg BB (E) membuktikan adanya peran curcumin sebagai antioksidan eksogen dalam membantu regenerasi sel β pankreas. Menurut Hussein dan Abu-Zinadah (2010) bahwa curcumin melepaskan hydrogen dari struktur fenolik (O-H) untuk berikatan dengan senyawa radikal bebas, sehingga dapat membantu proses regenerasi sel β dalam menghasilkan insulin pada penderita DM. Kadar insulin yang meningkat akan menurunkan kadar glukosa darah ke tingkat yang normal, sehingga memperbaiki kerusakan oksidatif akibat reaktivitas radikal bebas.

Kandungan curcumin dalam ekstrak ethanol *Curcuma longa* L. memiliki potensi sebagai antioksidan yang dapat mencegah stress oksidatif. Ikatan karbon rangkap dan cincin fenil pada curcumin mengandung sejumlah substituent hidroksil dan metoksil (Barzegar, 2012). Melalui strukturnya ini curcumin dapat menangkap ROS yang berlebihan penyebab utama terjadinya stress oksidatif. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa curcumin melindungi membran endotel dari peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid dapat

menyebabkan kerusakan membran sel melalui radikal bebas yang berasal dari reaksi berantai dan curcumin sebagai antioksidan mampu menghambat pembentukan radikal bebas superoksida dan menghambat proses lipid peroksidasi.

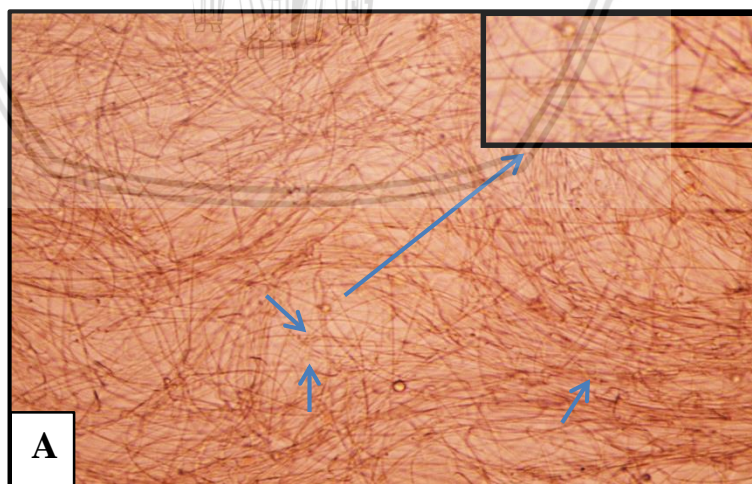
Keberadaan curcumin dalam ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* dapat menekan terjadinya peroksidasi lipid (Quiles, 2002). Penekanan reaksi peroksidasi lipid oleh atom hidrogen dari gugus OH yang terletak pada cincin kromanolnya ke senyawa radikal bebas dapat menghentikan proses peroksidasi lipid di membran spermatozoa, akibatnya kondisi membran spermatozoa dapat terjaga dengan baik (Bansal dan Bilaspuri, 2009). Struktur matriks lipid yang baik menyebabkan membran menjadi stabil, dan meningkatkan fluiditas membran yang berfungsi sebagai sarana transportasi energi dalam bentuk ATP yang digunakan untuk pergerakan spermatozoa sehingga motilitas spermatozoa yang bergerak progresif meningkat.

5.3 Efek Pemberian Ekstrak Ethanol *Curcuma longa L.* Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Diabetes Mellitus Tipe 1 Terhadap Viabilitas Spermatozoa.

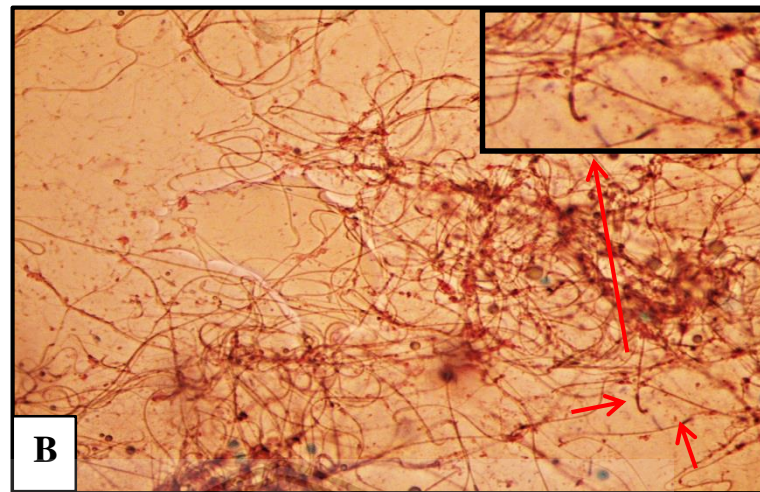
Kondisi hiperglikemik pada Diabetes Melitus (DM) memicu terbentuknya stress oksidatif. yang menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Salah satu indikator penentu kualitas spermatozoa adalah viabilitas, karena berhubungan dengan daya hidup spermatozoa (Suyadi dkk., 2012).


Menurut El-Masry (2012) kandungan kurkumin dalam ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* memiliki efek antioksidan yang dapat meningkatkan efek antioksidan seluler. Hal ini memberikan kontribusi untuk perlindungan terhadap kerusakan oksidatif pada DM hasil induksi streptozotocin.

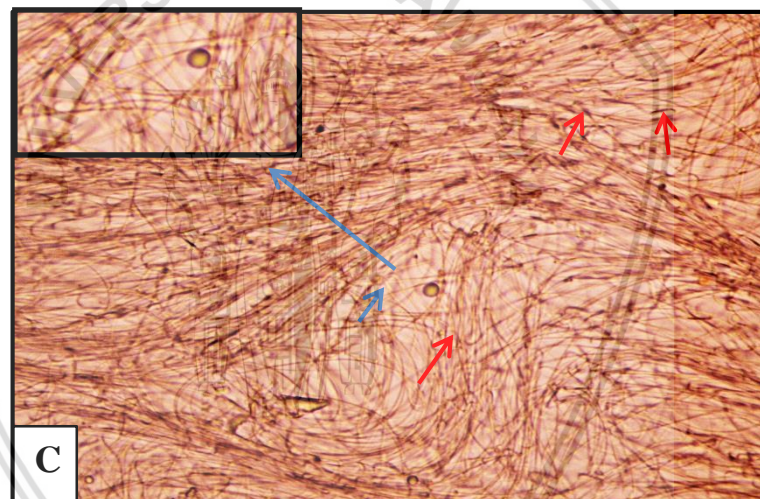
Pada **Gambar 5.1** pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan secara langsung menggunakan mikroskop Olympus BX51 pada perbesaran 400x. Saili *et al.*, (2006) menyatakan bahwa untuk membedakan spermatozoa hidup dan mati, dapat dilihat pada bagian kepala spermatozoa. Spermatozoa yang hidup tidak terwarnai, sedangkan spermatozoa yang mati pada bagian kepalanya akan berwarna merah keunguan dengan pewarnaan eosin. Spermatozoa mati akan menyerap zat warna disebabkan karena rusaknya membran plasma spermatozoa. Viabilitas dapat dinilai setelah dilakukan metode pewarnaan diferensial menggunakan zat warna eosin (Aminasari, 2009).





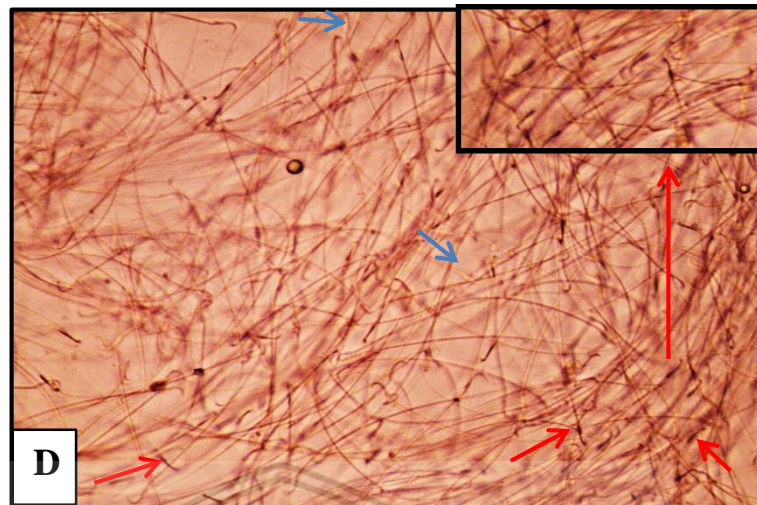
Gambar 5.1. Viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol negatif (A) selama 42 hari perbesaran 400x. Keterangan : (→) spermatozoa hidup, kepala spermatozoa tidak terwarnai zat warna eosin.



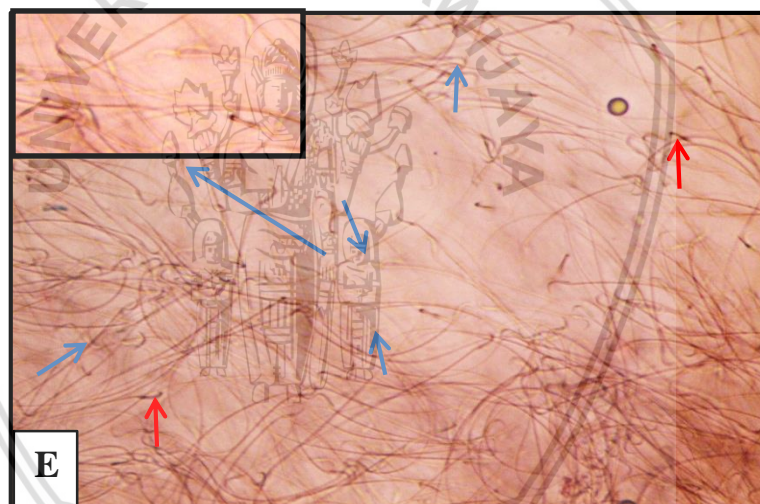
Gambar 5.2. Viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus kelompok kontrol positif (B) selama 42 hari perbesaran 400x. Keterangan : () spermatozoa mati, kepala spermatozoa terwarnai zat warna eosin.



Gambar 5.3. Viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus yang mendapat terapi ekstrak ethanol *Curcuma longa* L. dosis 1,2 g/KgBB (C) selama 42 hari. Keterangan : () spermatozoa mati; () spermatozoa hidup.



Gambar 5.4. Viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus yang mendapat terapi ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* dosis 1,8 g/KgBB (D) selama 42 hari. Keterangan: (↖) spermatozoa mati; (↗) spermatozoa hidup.



Gambar 5.4. Viabilitas spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes mellitus yang mendapat terapi ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* dosis 2,7 g/KgBB (D) selama 42 hari. Keterangan: (↖) spermatozoa mati; (↗) spermatozoa hidup.

Hasil pengamatan efek pemberian ekstrak *Curcuma longa L.* pada tikus DM terhadap viabilitas spermatozoa menggunakan uji *one-way analisis of varian* (ANOVA) dan uji lanjutan menggunakan uji Tukey menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0,05$) secara lengkap dapat dilihat

pada **Lampiran 6**. Pemberian terapi ekstrak ethanol rimpang kunyit memberikan pengaruh berupa peningkatan viabilitas spermatozoa. Jumlah rata-rata peningkatan viabilitas spermatozoa pada berbagai kelompok perlakuan diperlihatkan pada **Tabel 5.2**.

Tabel 5.2 Rata-rata viabilitas spermatozoa pada tikus berbagai perlakuan

Kelompok	Rata-rata viabilitas spermatozoa \pm SD	Penurunan viabilitas spermatozoa terhadap KN (%)	Peningkatan viabilitas spermatozoa terhadap KP (%)
Kontrol Negatif (A)	18.600 \pm 2,377 ^c	-	-
Kontrol Positif (B)	3.025 \pm 0,368 ^a	83,73	-
Dosis 1,2 g/Kg BB (C)	3.875 \pm 1,021 ^a	-	21,93
Dosis 1,8 g/Kg BB (D)	9.075 \pm 3,320 ^b	-	66,68
Dosis 2,7 g/Kg BB (E)	14.925 \pm 2,547 ^c	-	79,73

Keterangan : Notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan.

Rata-rata viabilitas spermatozoa berbagai perlakuan pada **Tabel 5.2** menunjukkan berbeda nyata pada setiap perlakuan ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* berbagai dosis memberikan pengaruh terhadap viabilitas spermatozoa yang diinduksi streptozotocin selama 42 hari. Hasil uji lanjutan Tukey menunjukkan bahwa rata-rata viabilitas spermatozoa tikus putih kelompok kontrol positif (B) berbeda secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan kontrol negatif (A). Hal ini disebabkan induksi STZ pada kelompok kontrol positif (B) menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa. Pada tikus DM yang diinduksi STZ terjadi peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) akibat pelepasan radikal nitrogen oksida (NO) dari STZ dan penurunan kapasitas antioksidan sehingga terjadi kerusakan spermatozoa dan testis tikus

DM (Amaral *et al.*, 2006). Kerusakan pada spermatozoa dan testis tikus DM ditandai dengan menurunnya viabilitas spermatozoa.

Penurunan viabilitas spermatozoa dapat disebabkan oleh stress oksidatif yang dialami spermatozoa pada DM. Hal ini disebabkan induksi streptozotocin mampu merusak sel pankreas dengan cara memproduksi ROS (Szkudelski, 2012). Kerusakan sel beta pankreas menyebabkan tubuh tidak bisa menghasilkan insulin sehingga menyebabkan kadar glukosa darah meningkat (terjadi keadaan hiperglikemia). Diabetes melitus ditandai dengan kondisi hiperglikemia yang disertai gangguan metabolisme karbohidrat, lipid, protein dan berkaitan dengan defisiensi insulin. Kondisi hiperglikemia menurut Kumawat *et al.*, (2011) akan mengakibatkan meningkatnya produksi radikal bebas sehingga terjadilah stress oksidatif. Stress oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mematikan spermatozoa. Peningkatan stress oksidatif memiliki daya rusak yang tinggi terhadap asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen utama dalam pembentukan fosfolipid membran plasma spermatozoa, jika membran plasma rusak maka akan berlanjut pada internal sel sehingga dapat menurunkan daya hidup. Membran plasma yang rusak akan menyebabkan terganggunya metabolisme sehingga produksi ATP sebagai sumber energi berkurang. Metabolisme akan berlangsung dengan baik apabila membran plasma berada dalam keadaan utuh, sehingga mampu mengatur lalu lintas keluar masuk sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme (Bebas *et al.*, 2016). Kerusakan pada membran spermatozoa akibat ROS dapat mengganggu aktifitas metabolisme

seluler sehingga kebutuhan dan transfer zat-zat elektrolit terganggu yang nantinya akan berujung pada kematian spermatozoa (Rizal, 2009). Spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna disebabkan karena rusaknya membran plasma pada spermatozoa sehingga pewarna eosin dapat masuk ke dalam sel dan tetap tinggal di dalam dan mewarnai spermatozoa menjadi merah keunguan terutama pada bagian kepala spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa menurun.

Pemberian terapi ekstrak ethanol kunyit pada kelompok dosis 1,2 g/Kg BB (C), 1,8 g/Kg BB (D) dan dosis 2,7 g/Kg BB (E) menunjukkan adanya perbedaan nyata antar perlakuan dalam meningkatkan viabilitas spermatozoa dibandingkan dengan kontrol positif (B). Terapi dosis 2,7 g/Kg BB (E) merupakan dosis terapi yang lebih baik karena memberikan perbedaan yang nyata terhadap tikus kelompok kontrol positif (B). Dosis ekstrak ethanol kunyit yang semakin tinggi diberikan maka semakin besar pengaruh kurkumin sebagai antioksidan dalam meningkatkan viabilitas spermatozoa pada tikus DM induksi STZ.

Ekstrak ethanol *Curcuma longa* L. diduga menurunkan kadar NO. Kadar NO dalam tikus DM menurun setelah diberi ekstrak ethanol *Curcuma longa* L. Hal ini disebabkan kandungan senyawa aktif dalam ekstrak ethanol kunyit terutama senyawa flavonoid dan kurkumin yang berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Vermeris dan Nicholson (2006) sebagai senyawa polifenol, flavonoid dan kurkumin dapat menangkap radikal bebas. Gugus hidroksil pada cincin aromatis senyawa flavonoid dan kurkumin

mendonasikan atom H pada radikal bebas, dan terbentuk radikal fenoksil flavonoid maupun kurkumin. Radikal baru yang terbentuk kemudian mengalami stabilisasi oleh sistem ikatan rangkap terkonjugasi sehingga radikal tersebut bersifat kurang reaktif. Adanya aktivitas antioksidan dalam ekstrak kunyit dapat mencegah terjadinya kelebihan radikal bebas baik NO, superoksida, maupun radikal hidroksil. Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi akan menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid pada kondisi DM sehingga permeabilitas membran kembali normal. Permeabilitas membran yang normal akan meningkatkan transport nutrisi yang diperlukan spermatozoa sehingga menyebabkan spermatozoa yang hidup (viabilitas) meningkat.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini, yaitu :

1. Pemberian ekstrak ethanol *Curcuma longa L.*, mampu meningkatkan motilitas spermatozoa pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus tipe 1. Dosis ekstrak kunyit terbaik terhadap peningkatan motilitas spermatozoa yaitu 2,7 g/KgBB.
2. Pemberian ekstrak ethanol *Curcuma longa L.*, mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa pada tikus (*Rattus norvegicus*) model diabetes mellitus tipe 1. Dosis ekstrak kunyit terbaik terhadap peningkatan viabilitas spermatozoa yaitu 2,7 g/KgBB.

6.2 Saran

Saran-saran yang dapat dikemukakan berdasarkan hasil penelitian adalah sebagai berikut.

1. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* terhadap kadar hormon reproduksi jantan tikus diabetes mellitus.
2. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui aplikasi penggunaan ekstrak ethanol *Curcuma longa L.* pada hewan penderita diabetes mellitus tipe 1.

DAFTAR PUSTAKA

- Adriani, S. 2012. Pengaruh Pemberian Pakan Dengan Tambahan Bekatul Terhadap Spermatogenesis Mencit (*Mus musculus L.*) Galur Swiss Webster. Universitas Pendidikan Indonesia.
- Agarwal A., Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma RK. 2009. *Oxidative Stress Measurement in Patients with Male or Female Factor Infertility*. In: Popov I, Lewin G (eds) Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment. Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India, pp. 195-218.
- Agbaje IM., Rogers DA., McVicar CM., McClure N., Atkison AB., Mallidis C., dan Lewis SEM. 2007. Insulin dependent diabetes mellitus: implication for male reproductive function. *Human Reproduction*. 22 (7): 1871-1877.
- Amaral, S., Oliveira, P.J., and Ramalho-Santos, J., 2008. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr. Diabetes. Rev.* 4(1): 46-54.
- American Diabetes Association. 2004. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Clinical Practice Recommendations. *Diabetes Care*. Vol. 27, No. 1:5-10.
- Atmadja, W. L., Y. Ito, G.L. Baker, and R.S. McCuskey, 2002. Effect of Curcuminoids As Antiinflammatory Agents on The Hepatic Microvascular Response to Endotoxin. *Shock*. 17 (5) : 399 – 403.
- Ballester J, Munoz C, Dominguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. 2004. Insulin-Dependent Diabetes Affects Testicular Function by FSH-and LH-Linked Mechanisms. *American Society of Andrology*; 1-3, 8-14.
- Davoud Kianifard, Rajab Ali. 2011. The Ultrastructural Changes of the Sertoli and Leydig Cells Following Streptozotocin Induced Diabetes. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.

- Diemer T., Allen J. A., Hales K. H. and Hales D. B. 2009. Reactive Oxygen Disrupts Mitochondria in MA-10 Tumor Leydig Cells and Inhibits Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein and Steroidogenesis. *Endocrinol.* 144(7): 2882–2891.
- Ganong WF. (editor alih bahasa Widjajakusumah MD). 2002. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran* ed. 20. Penerbit EGC. Jakarta.
- Gunawan, D. 2002. *Ramuan tradisional untuk keharmonisan suami istri*. PT. Penebar Swadaya. Bogor.
- Gustaviani R. 2006. *Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Mellitus*. Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Guyton A.C, Hall EJ. 1996. Buku ajar fisiologi kedokteran. Ed. 9, Editor : Setiawan I. EGC. Jakarta
- Hardijanto., T. Sardjito., T. Hernawati., S. Susilowati dan TW. Suprayogi. 2008. *Penuntun Praktikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (IB)*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 8-18.
- Hayati A, Karolina L., Subani NB, Yudiwati R. 2014. The Potential of Garcianamangostana Pericarp Extract on Spermatogenesis and Sperm Quality of Mice (*Mus musculus*) After 2-Methoxyethanl Exposure. *Journal of Applied Environmental and Biological Science*; 4(4), p. 47-51.
- Kandeel FR, Koussa VKT, Sverdloff RS. 2001. Male Sexual Function and Disorders : Physiology, Pathophysiology, Clinical Invertigation, and Treatment. *The Endocrine Society* : 14-9.
- Kahn, C.R. 1995. Disorder of Fuel Metabolism. Dalam Becker, K.L. (Ed.), *Priciples and Practice of Endocrinology and Metabolism*, 2nd Ed. 1148-54
- Kapoor D, Malkin CJ, Channer KS, Jones TH. 2005. Androgens, Insulin Resistance and Vaskular Disease in Men. Blackwell Publishing.//<http://www.medscape.com/>. [19 Oktober 2013]

- Kohli K., Ali J., Ansari M.J., & Raheman Z. 2004. Curcumin: A Natural Antiinflammatory Agent. *Indian Jurnal of Pharmacology*. 37(3):141-147
- Kuo, M.L., T.S. Huang dan J.K. Lin, 1996. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochem. Biophys. Acta – Molecular Basis of Disease*. 1317 (2) : 95 – 100.
- Lawrence, J.C. 1992. *Insulin and Oral Hypoglycemic Agents*. Mosby. London
- Lin HY, Xu Q, Yeh S, Wang RS, Sparks JD, Chang C. 2005. Insulin and Leptin Resistance with Hyperleptinemia in Mice Lacking Androgen Receptor. *Diabetes* 54:1717-1725.
- Malole, M.B.M., & Pramono C.S.U. 1989. *Penggunaan Hewan-Hewan Percobaan di Laboratorium*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor
- Mardiati R. 2000. *Buku Kuliah Faal Endokrin*. PT. Sagung Seto. Jakarta
- Masharani U, Karam JH. 2005. *Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus*. In Basic & Clinical Endocrinology. 10th ed. Greenspan FS, Gardner DG (eds), Mc Graw Hill, New York.
- Mc Wright B. (diterjemahkan Nadjamuddin). 2008. *Panduan Bagi Penderita Diabetes*. Penerbit Prestasi Pustaka Publisher. Jakarta
- Mills, S. & K. Bone, 2000. Principles and practice of phytotherapy : Modern Herbal Medicine. Churchill Liveingstone. London.
- Paulsen D.F. 2000. Histology and Cell Biology Examination and Board review 1st Edition. McGraw-Hill. Singapore.
- Rachmadi A. 2008. Kadar Gula Darah dan Kadar Hormon Testosteron Pada Pria Penderita Diabetes Melitus Hubungannya Dengan Disfungsi Seksual Dan Perbedaannya Dengan Yang Tidak Mengalami Disfungsi Seksual [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.

Ridwan E. 2013. Riset Kesehatan Dasar 2013 badan Penelitian dan Perkembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.

Rukmana, R., 1994. *Kunyit*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.

Sherwood L. 2011. *Fisiologi Manusia : Dari Sel ke Sistem* Edisi 7. EGC. Jakarta.

Triplitt, C. L., Reasner, C. A. & Isley, W. L. 2008, Endocrinologic Disorders: Diabetes Mellitus, Editor: Dipiro, T. J., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G. & Posey, L. M., Pharmacotherapy Approach, 7th edition, McGraw-Hill, New York.

Widowati, W. 2008. Potensi Antioksidan sebagai Antidiabetes, *JKM*. Vol 7., No.2 ; 193-202.

WHO. 1998. Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3th Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.

Zhang DW, Fu M, GaoSH, Liu JL, 2013. Curcumin and Diabetes: A Systemic Review. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 63603.